

УДК 577.29; 577.15

С. М. САВИНА, член-корреспондент Н. В. ШАЛЫГО

**ПОТЕНЦИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ  
В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ТАБАКА  
С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ***Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь  
svetlanapavluchkova@yandex.ru; shalygo@ibp.org.by*

Трансформация растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) генами *Mn-SOD* и *Fe-SOD* арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) приводит к потенцированию антиоксидантной системы в клеточных компартментах, что выражается в возрастании не только активности СОД за счет ее дополнительного количества, но и в увеличении активности компонентов защитной системы, участвующих в детоксикации пероксида водорода.

*Ключевые слова:* трансгенные растения, супероксиддисмутаза, антиоксидантные ферменты, активные формы кислорода, антиоксиданты, *Nicotiana tabacum*.

S. M. SAVINA, N. V. SHALYGO

**POTENTIATION OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS  
WITH THE OVEREXPRESSION OF SUPEROXIDE DISMUTASE***Institute Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
svetlanapavluchkova@yandex.ru; shalygo@ibp.org.by*

The genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. plants with *Mn-SOD* and *Fe-SOD* *Arabidopsis thaliana* L. genes leads to the potentiation of the antioxidant system in cellular compartments, which is manifested not only in a SOD activity increase by its additional amount, but also in an increase of protective components activity involved in hydrogen peroxide detoxification.

*Keywords:* transgenic plants, superoxide dismutase, antioxidant enzymes, reactive oxygen species, antioxidants, *Nicotiana tabacum*.

**Введение.** В условиях действия стрессовых факторов в клетках растений накапливаются активные формы кислорода (АФК), которые индуцируют развитие окислительных реакций, приводящих к повреждению клеточных мембран и негативно сказывающихся на растительном организме в целом. Уровень АФК регулируется защитной антиоксидантной системой, компонентами которой являются низкомолекулярные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты [1]. В литературе имеются сведения о том, что трансформация растений генами, кодирующими антиоксидантные ферменты, снижает повреждающее действие АФК при стрессе. Показано, что трансгенные растения табака с повышенной экспрессией генов, ответственных за синтез аскорбатпероксидазы (АПР), разрушающей пероксид водорода в хлоропластах и в цитозоле, обладали повышенной устойчивостью к окислительному стрессу, вызванному фотосенсибилизаторами и низкой температурой [2]. Растения с повышенной экспрессией генов, кодирующих супероксиддисмутазу (СОД) – прооксидантный фермент, имеющий ряд изоформ (Cu/Zn-СОД, Mn-СОД и Fe-СОД [3]) и участвующий в детоксикации супероксидного анион-радикала с образованием пероксида водорода, характеризовались повышенной устойчивостью к действию стрессоров по сравнению с диким типом (ДТ). Так, растения табака, арабидопсиса и картофеля, трансформированные хлоропластной и цитозольной изоформами Cu/Zn-СОД, а также растения кукурузы и тополя с повышенной экспрессией митохондриальной Mn-СОД имели более высокую

устойчивость к параквату, свету высокой интенсивности, метилвиологену, озону, солевому стрессу и тяжелым металлам [4–10]. Однако ряд важных аспектов функционирования антиоксидантной системы в трансгенных по СОД растениях, таких как изменение активности изоформ СОД, не затронутых трансформацией, модификация активности других антиоксидантных ферментов и уровня низкомолекулярных антиоксидантов в таких трансформантах остаются малоизученными. Целью настоящей работы стал сопоставительный анализ антиоксидантного статуса растений табака, трансформированных геном митохондриальной СОД (*Mn-SOD*) и хлоропластной СОД (*Fe-SOD*) арабидопсиса, и растений ДТ, включающий определение активности основных антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы (КАТ), АПР, глутатионредуктазы (ГР), а также содержания низкомолекулярных антиоксидантов (аскорбата, глутатиона и фенольных соединений).

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали 4-й лист 45-дневных проростков табака (*Nicotiana tabacum* L.), трансформированных геном *Mn-SOD* и *Fe-SOD* арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L.) с лидерной последовательностью для транспортировки Mn-СОД в митохондрии и Fe-СОД в хлоропласты. Семена трансформантов были любезно предоставлены профессором Б. Гриммом (Берлинский университет им. А. Гумбольдта, Германия).

Растения ДТ и трансформанты выращивали в пластмассовых емкостях в грунте «Восторг» («Карио», Беларусь), используя люминесцентные лампы белого света Philips TL-D 36W/765 в режиме 14 ч света (интенсивность  $160 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) и 10 ч темноты при температуре  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  и относительной влажности воздуха 50–60 %.

Определение общей активности СОД и АПР, а также их отдельных изоформ проводили с помощью нативного гель-электрофореза, как описано в [11; 12]. Общую активность КАТ и ГР регистрировали спектрофотометрическим методом, изложенным в [11]. Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) измеряли с использованием спектрофлуорометрического метода [13], для количественного определения общего и восстановленного аскорбата применяли спектрофотометрический метод [14]. Суммарное содержание фенольных соединений в экстракте

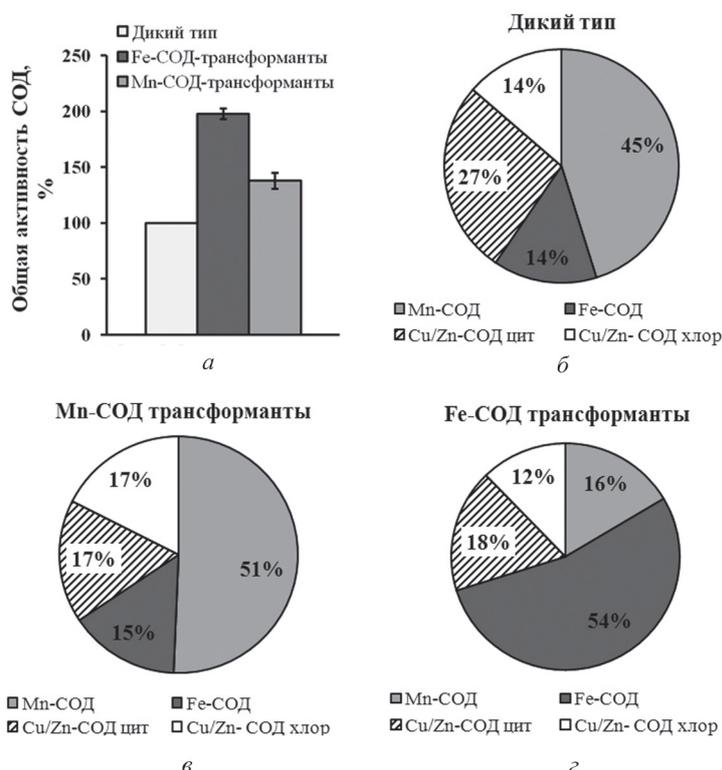


Рис. 1. Общая активность СОД и активности отдельных изоформ СОД в четвертом листе растений табака: а – общая активность СОД в Fe-СОД и Mn-СОД трансформантах в % по отношению к дикому типу; б, в и з – активности отдельных изоформ СОД в диком типе, Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах соответственно; Cu/Zn-СОД цит и Cu/Zn-СОД хлор – цитозольная и хлоропластная Cu/Zn-СОД соответственно

листьев определяли с использованием спектрофотометрического метода [15]. Количество пероксида водорода оценивали по [16].

В сообщении представлены результаты трех опытов, проведенных в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2007.

**Результаты и их обсуждение.** Общая активность СОД в Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантах была в 1,4 и в 2,0 раза выше по сравнению с ДТ соответственно (рис. 1, а), что обусловлено присутствием в трансгенных растениях табака Mn-СОД и Fe-СОД арабидопсиса. На это указывают полученные нами ранее данные по составу изоформ СОД в растениях ДТ и в трансформантах [11]. Было установлено, что СОД в ДТ представлена пятью изоформами: одной митохондриальной Mn-СОД, одной хлоропластной Fe-СОД, одной цитозольной и двумя хлоропластными Cu/Zn-СОД. В Fe-СОД- и Mn-СОД-трансформантах табака регистрировались дополнительные изоформы СОД – Fe-СОД и Mn-СОД соответственно, принадлежащие арабидопсису.

Анализ активности отдельных изоформ СОД показал, что в ДТ на долю митохондриальной Mn-СОД приходится 45 % от общей активности фермента. При этом активность цитозольной Cu/Zn-СОД составляла 27 %, активность хлоропластной Fe-СОД и хлоропластной Cu/Zn-СОД была одинаковой и составила 14 % (рис. 1, б). В Mn-СОД-трансформантах активность Mn-СОД возросла в 1,5 раза и составила 50 % от общей активности фермента. На долю хлоропластной Fe-СОД, цитозольной и хлоропластной Cu/Zn-СОД приходилось 15, 17 и 18 % соответственно (рис. 1, в). Из представленных данных видно, что снизилась активность цитозольной Cu/Zn-СОД. Активность Fe-СОД в Fe-СОД-трансформантах была в 7 раз выше, чем в ДТ за счет возрастания доли Fe-СОД, которая составила 54 % от общей активности фермента (рис. 1, г). Кроме того, в таких трансформантах было зафиксировано снижение активности других изоформ СОД – митохондриальной Mn-СОД, цитозольной и хлоропластной Cu/Zn-СОД до 16, 18 и 12 % от общей активности фермента соответственно (рис. 1, г).

Установлено, что в трансгенных по СОД растениях происходило возрастание общей активности АПР. Так, в Fe-СОД-трансформантах активность фермента возрастала на 27 %, а в Mn-СОД-трансформантах – на 16 % по сравнению с ДТ (рис. 2, а). Анализ отдельных изоформ АПР позволил установить, что в растениях ДТ активность цитозольной изоформы АПР превышала активность хлоропластной изоформы фермента в 2 раза (табл. 1). В Mn-СОД-трансформантах активность обеих изоформ фермента повышалась в равной степени, в то время как в Fe-СОД-трансформантах повышение активности АПР было связано с возрастанием активности преимущественно хлоропластной изоформы АПР (табл. 1). Следует отметить, что активация СОД и АПР регистрировалась ранее в трансгенных растениях томата с повышенной экспрессией *Fe-SOD* [17]. Авторы показали, что трансформация растений томата с использованием гена *Fe-SOD1* арабидопсиса при транспортировке продукта в хлоропласт приводит не только к активации СОД

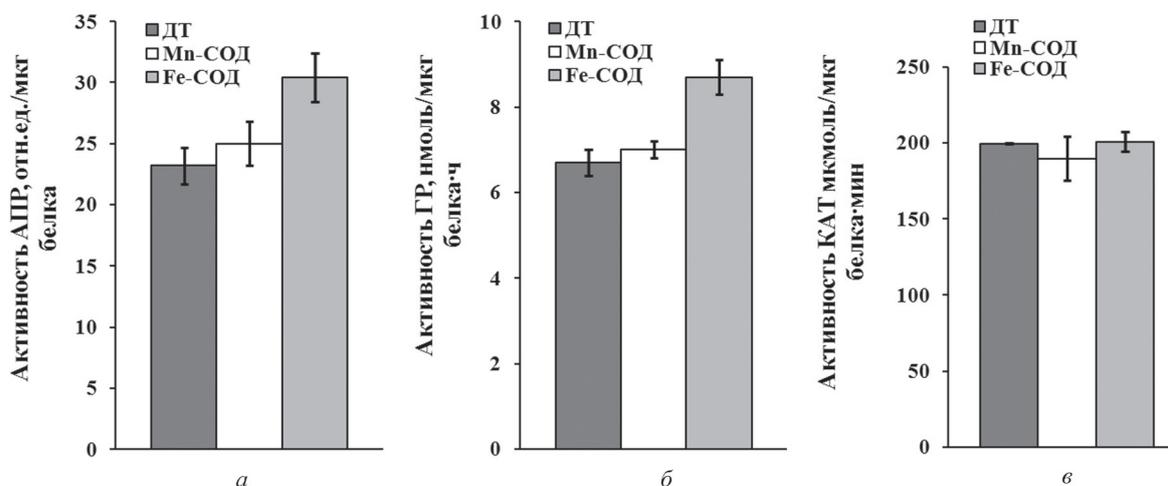


Рис. 2. Общая активность АПР (а), ГР (б) и КАТ (в) в четвертом листе растений табака дикого типа (ДТ), а также Mn-СОД- и Fe-СОД-трансформантов (Mn-СОД и Fe-СОД соответственно)

и АПР, но и вызывает изменения в ультраструктурной организации пластид в клетках фотосинтезирующих тканей растений, что может существенно влиять на происходящие в пластидах метаболические процессы [17].

Т а б л и ц а 1. Активность изоформ АПР в четвертом листе трансгенных по Mn-SOD и по Fe-SOD растениях табака и ДТ

Вариант	Цитозольная АПР, отн. ед. (% к ДТ)	Хлоропластная АПР, отн. ед. (% к ДТ)
ДТ	15,7 ± 0,3 (100)	7,5 ± 1,2 (100)
Mn-SOD	16,6 ± 0,2 (106)	8,4 ± 1,6 (112)
Fe-SOD	18,5 ± 0,7 (118)	11,9 ± 1,3 (157)

В трансгенных по СОД растениях табака зафиксирована повышенная активность ГР, фермента, восстанавливающего GSH из GSSG. Общая активность ГР в трансгенных по Mn-SOD растениях превышала дикий тип на 30 %, а в трансгенных по Fe-SOD растениях – на 4 % (рис. 2, в).

Изменение общей активности КАТ – фермента, разрушающего пероксид водорода в пероксиосомах и в митохондриях [18], в трансгенных по Mn-SOD и по Fe-SOD растениях практически не наблюдалось (рис. 2, з).

Трансгенные растения и растения ДТ отличались по уровню аскорбата и водорастворимых фенольных соединений. В частности, содержание общего и восстановленного аскорбата в Mn-SOD-трансформантах было на 30 и 45 % выше, чем в ДТ соответственно (рис. 3, а). В Fe-SOD-трансформантах общее содержание аскорбата оказалось соизмеримо с показателем, зарегистрированным в ДТ, однако уровень восстановленной формы аскорбата был ниже ДТ на 53 % (рис. 3, а). Пониженный уровень восстановленного аскорбата коррелирует с высоким уровнем активности АПР, для которой он является субстратом. Практически неизменный уровень общего аскорбата в таких растениях на фоне высокой активности АПР указывает на то, что пул восстановленного аскорбата пополняется из его окисленной формы, а не за счет синтеза *de novo*. Наибольшим содержанием водорастворимых фенольных соединений характеризовались Mn-SOD-трансформанты (рис. 3, в). В таких растениях уровень фенолов был выше, чем в ДТ и Fe-SOD-трансформантах на 40 и 27 % соответственно (рис. 3, в). Достоверных различий в содержании общего глутатиона, а также в количестве его восстановленной и окисленной формы в обоих типах трансформантов и в ДТ зафиксировано не было (рис. 3, б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что трансформация растений табака генами СОД (*Mn-SOD* или *Fe-SOD* арабидопсиса) изменяет антиоксидантный статус клеток, а именно, активирует (потенцирует) антиоксидантную систему не только за счет возрастания количества СОД, но и за счет увеличения активности отдельных компонентов антиоксидантной системы,

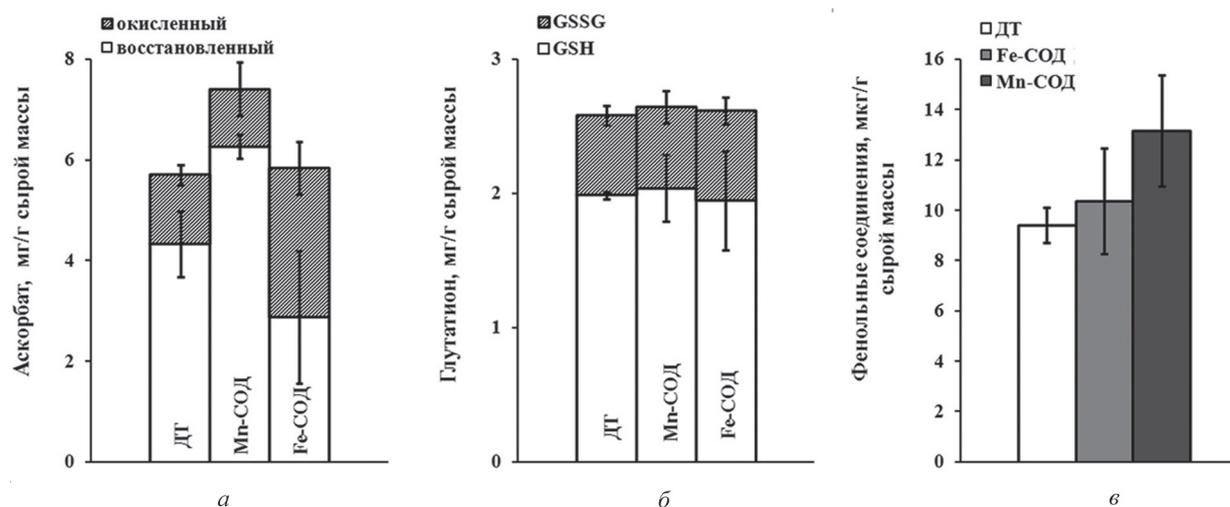


Рис. 3. Содержание аскорбата (а), глутатиона (б) и водорастворимых фенольных соединений (в) в четвертом листе растений табака дикого типа (ДТ), а также Mn-SOD- и Fe-SOD-трансформантов (Mn-SOD и Fe-SOD соответственно)

участвующих в детоксикации пероксида водорода. Это подтверждают и результаты анализа  $H_2O_2$  в трансгенных растениях и в растениях ДТ. Так, в Fe-СОД-трансформантах и, особенно, в Mn-СОД-трансформантах содержание  $H_2O_2$  было ниже контроля (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Содержание  $H_2O_2$  в четвертом листе трансгенных по Mn-СОД и Fe-СОД растений табака и растений ДТ

Вариант	Содержание $H_2O_2$ , нмоль/г сырой массы (% к ДТ)
ДТ	$0,51 \pm 0,07$ (100)
Mn-СОД	$0,41 \pm 0,08$ (80)
Fe-СОД	$0,48 \pm 0,05$ (94)

Особо следует остановиться на активности СОД, преобразующей супероксидный анион-радикал в  $H_2O_2$ , и системе детоксикации пероксида водорода в клеточных компартментах. Ранее нами было установлено, что вся Mn-СОД арабидопсиса локализована в митохондриях Mn-СОД-трансформантов табака, в то время как 90 % Fe-СОД арабидопсиса в Fe-СОД-трансформантах табака оказалась локализованной в цитозоле, на хлоропласты приходилось только 10 % Fe-СОД арабидопсиса [19]. В Fe-СОД-трансформантах нами была зарегистрирована высокая активность АПР. При этом наиболее высокая активность АПР регистрировалась в цитозоле. Активность хлоропластной АПР по абсолютным значениям была ниже, чем цитозольной, однако наибольшая степень активации относительно ДТ приходилась именно на хлоропластную АПР (табл. 1). Это может быть обусловлено тем, что в цитозоле кроме АПР имеются другие ферменты, разрушающие пероксид водорода [20]. В митохондриях пероксид водорода разрушается с участием КАТ. Однако мы не обнаружили достоверного возрастания общей активности КАТ в трансформантах с повышенной экспрессией *Mn-SOD*. Возможно, это связано с тем, что в отличие от пероксидаз, которые активируются при достаточно низком уровне  $H_2O_2$ , КАТ активируется только при его высоких концентрациях. В то же время в Mn-СОД-трансформантах регистрировалась повышенная активность цитозольной и хлоропластной АПР, высокий уровень аскорбата и фенольных соединений, что свидетельствует о потенцировании системы детоксикации  $H_2O_2$  в цитозоле и в хлоропластах таких растений. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в основе повышенной устойчивости трансгенных по СОД растений к стрессовым факторам лежит активация антиоксидантной защитной системы в клеточных компартментах, вызванная трансгенозом.

**Заключение.** Таким образом, показано, что трансформация растений табака генами *Mn-SOD* и *Fe-SOD* арабидопсиса приводит к потенцированию антиоксидантной системы в клеточных компартментах, что выражается в возрастании не только активности СОД за счет ее дополнительного количества, но и в увеличении активности компонентов защитной системы, участвующих в детоксикации пероксида водорода.

### Список использованной литературы

1. Шальго, Н. В. Функционирование защитной системы растительной клетки в условиях окислительного стресса / Н. В. Шальго // Годневские чтения «Фотобиология растений и фотосинтез». – Минск: Право и экономика, 2015.
2. Козел, Н. В. Аскорбат-глутатионовый цикл в растениях табака с повышенной экспрессией аскорбатпероксидазы при абиотическом стрессе / Н. В. Козел, В. П. Доманский // Вестн. Фонда фундаментальных исследований. – 2012. – № 1(59). – С. 89–100.
3. Бараненко, В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–473.
4. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase / A. Sen Gupta [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 1629–1633.
5. Enhanced oxidative stress defence in transgenic potato plants expressing tomato Cu/Zn-superoxide dismutase / A. Perl [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 85. – P. 568–576.
6. Трансформанты табака с геном Fe-СОД1 как модель для изучения формирования алюмоустойчивости / И. Г. Широких [и др.] // Агрехимия. – 2015. – № 2. – С. 79–85.
7. Expression of SOD and APX genes positively regulates secondary cell wall biosynthesis and promotes plant growth and yield in Arabidopsis under salt stress / A. Shafi [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2015. – Vol. 87, Iss. 6. – P. 615–631.

8. Enhanced salt tolerance of transgenic polar plants expressing manganese superoxide dismutase from *Tamarix Androssowii* / Y. C. Wang [et al.] // Mol. Bio. Rep. – 2010. – Vol. 35. – P. 1119–1124.
9. Kingston-Smith, A. Overexpression Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities / A. Kingston-Smith, Ch. Foyer // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol. 51, Iss. 352. – P. 1867–1877.
10. Overproduction of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize / F. Van Breusegem [et al.] // Plant Cell Physiol. – 1999. – Vol. 40. – P. 515–523.
11. Павлючкова, С. М. Функционирование антиоксидантной системы в растениях табака (*Nicotiana tabacum*), трансформированных смысловым геном супероксиддисмутазы, при низкотемпературном стрессе / С. М. Павлючкова, Н. В. Шалыго // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 2. – С. 91–95.
12. Mittler, R. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium / R. Mittler, B. Zilinskas // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 212. – P. 540–546.
13. Спектрофлуориметрический метод определения окисленного и восстановленного глутатиона в растениях / Н. В. Шалыго [и др.] // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 3. – С. 264–270.
14. Law, M. Y. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat / M. Y. Law, S.A. Charles, B. Halliwell // Biochem. J. – 1983. – Vol. 210. – P. 899–903.
15. Запрометов, М. Н. Основы биохимии фенольных соединений / М. Н. Запрометов. – М.: Высш. шк., 1974. – 214 с.
16. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative / J. G. Mohanty [et al.] // J. Immunol. Methods. – 1997. – Vol. 202, Iss. 2. – P. 133–141.
17. Структурная организация хлоропластов растений томата *Solanum lycopersicum*, трансформированных геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы / Е. К. Серенко [и др.] // Биол. мембраны. – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 215–223.
18. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models / A. Mhamdi [et al.] // J. Exp. Bot. – 2010. – Vol. 61, Iss. 15. – P. 4197–4220.
19. Павлючкова, С. М. Внутриклеточная локализация супероксиддисмутазы в трансгенных по Fe-SOD и по Mn-SOD растениях табака / С. М. Павлючкова, Н. В. Шалыго // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сб. ст. XI съезда Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз., Минск, 17–20 июня 2014 г.: в 2 т. / Ин-т биофиз. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. гос. ун-т, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз.; редкол.: И. Д. Волоотовский [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014. – Т. 2. – С. 119–121.
20. Колупаев, Ю. Е. Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров / Ю. Е. Колупаев, Ю. В. Карпец, А. И. Обозный // Вісн. харків. Нац. аграр. ун-ту. Сер. біологія. – 2011. – Вип. 1, № 22. – С. 6–34.

Поступило в редакцию 05.08.2015